

# SUSTAINED-RELEASE COMPOSITION, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND PREPARATION OF THE SAME

Patent number: JP2004075662

Publication date: 2004-03-11

Inventor: MIZUSHIMA YUTAKA; TAKAGI YUKIE; HANEKI TOMOMI; IKOMA TOSHIYUKI

Applicant: MUKKU KK

Classification:

- International: **A61K9/00; A61K9/14; A61K9/16; A61K9/00; A61K9/14; A61K9/16;** (IPC1-7): A61K47/04; A61K9/06; A61K9/10; A61K9/18; A61K9/19; A61K47/02; A61K47/36; A61K47/42

- european: A61K9/00M4; A61K9/14H2; A61K9/16H2

Application number: JP20020374173 20021225

Priority number(s): JP20020374173 20021225; JP20020179788 20020620

Also published as:



EP1514538 (A1)

WO2004000270 (A1)

AU2003242046 (A1)

Report a data error here

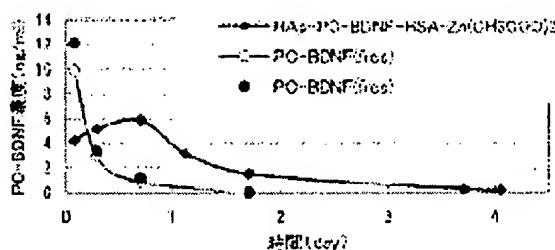
## Abstract of JP2004075662

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a sustained-release composition capable of obtaining the sustained-release effect for a long period by an injection of fine particles in an amount not causing pain subcutaneously or intramuscularly.

**SOLUTION:** This sustained-release composition is obtained by filling pores presenting in porous hydroxyapatite fine particles with a physiologically active medicine, human serum protein and mucopolysaccharide, and occluding by adding a divalent metal ion. Also, the composition is obtained by filling the pores presenting in the porous hydroxyapatite fine particles with the physiologically active medicine, the human serum protein and a water soluble calcium salt one by one or at once time and then occluding the outer layer of the fine particles by adding sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate or an aqueous solution of carbonate ion.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

図1 皮下投与におけるPO-BDNFの血中濃度の推移  
(PO-BDNF量としてHApサンプルは300μg/匹、Gelは150μg/匹を投与)



Best Available Copy

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-75662

(P2004-75662A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004. 3. 11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 61 K 47/04

A 61 K 47/04

4 C 0 7 6

A 61 K 9/08

A 61 K 9/06

A 61 K 9/10

A 61 K 9/10

A 61 K 9/18

A 61 K 9/18

A 61 K 9/19

A 61 K 9/19

審査請求 未請求 請求項の数 34 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-374173 (P2002-374173)  
 (22) 出願日 平成14年12月25日 (2002. 12. 25)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-179788 (P2002-179788)  
 (32) 優先日 平成14年6月20日 (2002. 6. 20)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 391043055  
 株式会社ムック  
 東京都港区愛宕二丁目5番1号  
 (74) 代理人 100096758  
 弁理士 高橋 剛  
 (74) 代理人 100114845  
 弁理士 高橋 雅和  
 (72) 発明者 水島 裕  
 東京都世田谷区梅丘1-1-11  
 (72) 発明者 高木 幸江  
 神奈川県川崎市多摩区長沢4-3-2  
 (72) 発明者 羽木 智美  
 神奈川県横浜市金沢区六浦町1347-7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 徐放性組成物、その製造方法およびその製剤

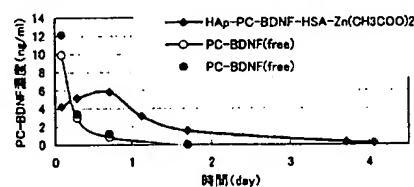
## (57) 【要約】

【課題】 人の皮下または筋肉内などに容易にしかも苦痛を起こさない量の同微粒子の注射で、長期にわたって徐放効果が得られる徐放性組成物を提供すること。

【解決手段】 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2価金属イオンを加えることにより栓塞したことからなる。又、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子の外層を栓塞してなる。

【選択図】 図1

ddymマウスにおけるPC-BDNFの血中濃度の推移  
 (PC-BDNF量としてHApサンプルは300  $\mu$ g/匹、freeは150  $\mu$ g/匹を投与)



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2価金属イオンを加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

## 【請求項 2】

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子がハイドロキシアパタイト懸濁液をスプレードライし、100～800℃で焼成したものであることを特徴とする請求項1記載の徐放性組成物。

## 【請求項 3】

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の粒径が0.1～20μmであることを特徴とする請求項1又は2記載の徐放性組成物。

## 【請求項 4】

前記生物学的活性薬剤の徐放性組成物中の含量が少なくとも0.01重量%であることを特徴とする請求項1記載の徐放性組成物。

## 【請求項 5】

前記ヒト血清タンパク質がヒト血清アルブミンあるいはγグロブリンであることを特徴とする請求項1記載の徐放性組成物。

## 【請求項 6】

前記ヒト血清タンパク質の徐放性組成物中の含量が少なくとも1重量%であることを特徴とする請求項1又は5記載の徐放性組成物。

## 【請求項 7】

前記2価金属イオンが亜鉛イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることを特徴とする請求項1記載の徐放性組成物。

## 【請求項 8】

前記2価金属イオンの徐放性組成物中の含量が少なくとも0.01重量%であることを特徴とする請求項1又は6記載の徐放性組成物。

## 【請求項 9】

前記ムコ多糖体がコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸あるいはケラタン硫酸及びそれらの塩、のうち少なくとも1種であることを特徴とする請求項1記載の徐放性組成物。

## 【請求項 10】

前記ムコ多糖体の徐放性組成物中の含量がヒト血清タンパク質の1/100以上であることを特徴とする請求項1又は9記載の徐放性組成物。

## 【請求項 11】

前記徐放性組成物が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布に適した形態であることを特徴とする請求項1から請求項10のいずれかに記載の徐放性組成物。

## 【請求項 12】

前記請求項1記載の組成物に、必要に応じて製剤学的に受容可能な添加物を加えたことからなることを特徴とする徐放性製剤。

## 【請求項 13】

前記製剤学的に受容可能な添加物が界面活性剤、防腐剤、又は安定化剤であることを特徴とする請求項12記載の製剤。

## 【請求項 14】

前記請求項12記載の製剤が凍結乾燥されたものであることを特徴とする製剤。

## 【請求項 15】

前記製剤が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布に適した形態であることを特徴とする請求項12から請求項14のいずれかに記載の製剤。

## 【請求項 16】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タン

10

20

30

40

50

バク質、ムコ多糖類を充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、それに2価金属イオン溶液を入れ、微粒子全体を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

【請求項17】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質を充填し、2価金属イオンを加えることにより該微粒子の外層に栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

【請求項18】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより該微粒子の外層を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

10

【請求項19】

前記水溶性のカルシウム塩が塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウムであることを特徴とする請求項18記載の徐放性組成物。

【請求項20】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子全体を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

【請求項21】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子の外層を栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

20

【請求項22】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面にハイドロキシアパタイトと特に結合性の高い生物学的活性薬剤を結合させてなることを特徴とする徐放性組成物。

【請求項23】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に生物学的活性薬剤を結合させ更に2価金属イオンを加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

30

【請求項24】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に2価金属イオンを結合させ更に生物学的活性薬剤を加えることにより栓塞してなることを特徴とする徐放性組成物。

【請求項25】

前記2価金属イオンが亜鉛イオン、銅イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることを特徴とする請求項23又は24記載の徐放性組成物。

【請求項26】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品を基材とともに充填し、これを軟膏、クリーム、ローションと混和してなることを特徴とする皮膚用徐放性組成物。

40

【請求項27】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び2価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

【請求項28】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び2価金属イオン溶

50

液を混合し、分離し、さらにこれを凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

【請求項29】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液を混合し、分離し、これを凍結乾燥後2価金属イオン溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

【請求項30】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これに炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

10

【請求項31】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

【請求項32】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

20

【請求項33】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これに2価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

【請求項34】

多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、2価金属イオン溶液を混和、して懸濁液を製し、これに生物学的活性薬剤からなる水溶液を混合し、分離して作製されることを特徴とする徐放性組成物の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子含有徐放性組成物、その製造法およびその製剤に関し、詳しくは栓塞処理したハイドロキシアパタイト微粒子含有徐放性組成物、その製造法およびその製剤さらには皮膚用徐放性組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

注射用徐放製剤は、再生医療への応用もでき、最近その重要性が増している。

これまで無機・有機微粒子やカプセル、ハイドロゲルなどによる徐放性製剤が開発されている。水溶性薬物の長期間にわたる徐放性注射剤は、これまでポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）を基剤にしてその多くは検討されてきた（例えば、特許文献1、特許文献2、特許文献3参照）。又、ヒト成長ホルモン（hGH）を含有するPLGAを基剤とした徐放性マイクロカプセルが報告されている（例えば、非特許文献1参照）。又、LHRHアゴニストであるリュープロレリンを含有するPLGAを基剤とした徐放性マイクロカプセルが報告されている（例えば、非特許文献2参照）。PLGAは生体内で加水分解して消失する生体内消化性の基剤で注射剤の基剤としては好ましい性質を有している。しかし、一般的にPLGAを使用する徐放性製剤を製造する際には、それを溶解する有機溶剤を使用するが、hGHは、有機溶剤中で変性し、一部が失活する。このような活性の低下は、有効性を損なうのみならず、生体にもわるい影響をもたらす危険性がある。さらに、h

40

50

GHは、水溶性が高く、PLGA製剤を用いると投与初期に過剰な放出をすることは避けられない。その他、ハイドロゲルなどの使用が報告されているが通常の注射投与は困難である。すなわち、ゲルが注入可能となる太い針を使用しなければならず、患者にとって好ましいものではない。また、ヒドロキシアパタイトと生物活性薬剤であるヒト成長ホルモンを用いた徐放性粒子についてすでに報告はある（例えば非特許文献3、非特許文献4参照）。しかし、いずれも2成分系であり、アパタイトの粒子径も40から80 $\mu$ mあるいは200 $\mu$ mと大きくそのため注射するのが困難であり、又、in vivoにおける徐放効果は不明である。又、アパタイト粒子に吸着したGH量（封入量）も1%以下と小さいものであった。

さらに、前記徐放性製剤には、バーストが起こるものがあり、器質化してバイオアベイラビリティがかなり落ちるものがあり、生体内で完全に分解されないものなどがあり、かつ超徐放が期待できないなど、いずれかの点で問題点があった。

【0003】

【特許文献1】

特開平11-286403（請求項1）

【特許文献2】

特開2000-239104（請求項1）

【特許文献3】

特開2002-326960（請求項13、15）

【非特許文献1】

Nature Medicine, 2: 795-799, 1996

【非特許文献2】

Chemical Pharmaceutical Bulletin, 36: 1095-1103, 1988

【非特許文献3】

H. Gautier et al: Journal of Biomedical Material Research, 40, 606-613, 1998

【非特許文献4】

J. Guicheux et al: Journal of Biomedical Material Research, 34, 165-170, 1997

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者は、これらの問題点を解決するために、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子のナノの空間を栓塞する徐放製剤の作製を試みた。まず、ハイドロキシアパタイトは生体反応性が少ないため、現在までの検討では、器質化がなく、焼き方によるが2～5週間で皮下で完全に溶解し、バイオアベイラビリティも良く、バーストも起こらず、そして、栓塞併用でかなりの徐放効果が得られることを発見した。

【0005】

そこで、本発明は、人の皮下または筋肉内に容易にしかも苦痛を起こさない量の同微粒子の注射で、長期にわたって徐放効果が得られる徐放性組成物、その製造法、その製剤及び皮膚用徐放性組成物を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するため、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤（高分子、低分子医薬品）、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填し、2価金属イオンを加えることにより栓塞してなるものである。

【0007】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質、ムコ多糖類を充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、それに2価金属イオン溶液を入れ、微粒子全体を栓塞してなるものである。

## 【0008】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質を充填し、2価金属イオンを加えることにより該微粒子の外層に栓塞してなるものである。

## 【0009】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子の外層を栓塞してなるものである。

## 【0010】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、ヒト血清アルブミン、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填した後、十分あるいは中等度凍結乾燥し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、該微粒子全体を栓塞してなるものである。

## 【0011】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔に生物学的活性薬剤、水溶性のカルシウム塩を次々または一度に充填し、次に炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより、微粒子の外層を栓塞してなるものである。

## 【0012】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面にハイドロキシアパタイトと特に結合性の高い生物活性薬剤を結合させてなるものである。

## 【0013】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に生物活性薬剤を結合させ更に2価金属イオンを加えることにより栓塞してなるものである。

## 【0014】

又、本発明の徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に存在する細孔の内部表面に2価金属イオンを結合させ更に生物活性薬剤を加えることにより栓塞してなるものである。

## 【0015】

又、本発明の皮膚用徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品を基材とともに充填し、これを軟膏、クリーム、ローションと混和してなるものである。

## 【0016】

この皮膚用徐放性組成物は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に充填されているので適切な量が皮膚に塗布される。そこで、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子から徐々に有効な成分が徐放されることになり、かつ多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に充填されている皮膚疾患治療薬剤または日焼け止めなどの医薬部外品等の紫外線吸収物質が徐々にしみ出す（即ち、徐放する）ので効果が持続することになる。

## 【0017】

本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び2価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されるものである。

## 【0018】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液及び2価金属イオン溶液を混合し、分離し、さらにこれを凍結乾燥することにより作製されるものである。

10

20

30

40

50

## 【0019】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤とヒト血清タンパク質からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これにムコ多糖類水溶液を混合し、分離し、これを凍結乾燥後2価金属イオン溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されるものである。

## 【0020】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これに炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を混合し、分離して作製されるものである。

10

## 【0021】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤、ヒト血清タンパク質及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されるものである。

## 【0022】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤及び水溶性のカルシウム塩からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、分離し、これを凍結乾燥後、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えてさらに凍結乾燥することにより作製されるものである。

20

## 【0023】

又、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、生物学的活性薬剤からなる水溶液を混和、して懸濁液を製し、これに2価金属イオン溶液を混合し、分離して作製されるものである。

## 【0024】

さらに、本発明の徐放性組成物の製造方法は、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子に、2価金属イオン溶液を混和、して懸濁液を製し、これに生物学的活性薬剤からなる水溶液を混合し、分離して作製されるものである。

## 【0025】

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子がハイドロキシアパタイト懸濁液をスプレードライし、100～800℃で焼成したものであることが好適である。800℃以上だと細孔がつぶれてしまい、100℃以下では焼成できないからである。

30

## 【0026】

前記多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の粒径が0.1～20μmであることが好適である。

## 【0027】

前記生物学的活性薬剤の徐放性組成物中の含量が少なくとも0.01重量%であることが好適である。

## 【0028】

前記ヒト血清タンパク質がヒト血清アルブミンあるいはγグロブリンであることが好適である。

40

## 【0029】

前記ヒト血清タンパク質の徐放性組成物中の含量が少なくとも1重量%であることが好適である。

## 【0030】

前記2価金属イオンが亜鉛イオン、銅イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンであることが好適である。

## 【0031】

前記2価金属イオンの徐放性組成物中の含量が少なくとも0.01重量%であることが好

50



適である。

【0032】

前記ムコ多糖体がコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸あるいはケラタン硫酸及びそれらの塩、のうち少なくとも1種であることが好適である。

【0033】

前記ムコ多糖体の徐放性組成物中の含量がヒト血清タンパク質の1/100以上であることが好適である。

【0034】

前記徐放性組成物が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布などに適した形態であることが好適である。 10

【0035】

又、本発明の徐放性製剤は、前記の組成物に、必要に応じて製剤学的に受容可能な添加物を加えたことからなることが好適である。

【0036】

前記製剤学的に受容可能な添加物が界面活性剤、防腐剤、又は安定化剤であることが好適である。

【0037】

前記製剤が凍結乾燥されたものであることが好適である。

【0038】

前記製剤が皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、眼球内投与及び皮膚塗布などに適した形態であることが好適である。 20

【0039】

前記水溶性のカルシウム塩が塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウムであることが好適である。

【0040】

さらに、本発明の特徴を下記に記載する。

本発明は外層栓塞と全層栓塞とからなっている。いずれの栓塞方法の場合でも、まず主薬を単独又は栓塞に使用する物質や安定剤とともに、多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、沈殿を生じさせる物質すなわち2価金属イオンや炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム又は炭酸イオン水溶液を加えることにより上記組成物を沈殿させることによって栓塞をつくる。或いは2価金属イオンを多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、次いで生物学的活性薬剤の水溶液を加えること、又、生物学的活性薬剤の水溶液を多孔性ハイドロキシアパタイトの細孔に入れ、次いで2価金属イオン溶液を加えることにより栓塞を形成させる。外層のみを栓塞する場合は組成物により内部の細孔を充填させた後、沈澱化物質を加える。全層を栓塞させる場合は、組成物の入った微粒子を一度凍結乾燥し、細孔に空気を入れ、沈澱化物が微粒子の内部にまで浸透することにより全層を栓塞することが出来る、ということである。 30

【0041】

なお、a) 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の大きさ、間隙のサイズと量、適切な焼成温度は何度が、b) 外層栓塞法の時、亜鉛塩、炭酸ナトリウムのみを最後に加えていること、又、医薬品、タンパク、ムコ多糖体は、混合液として充填した方が良いか、順次加えた方が良いか、c) 全体を栓塞する場合、凍結乾燥は完全にすることが良いか中等度が良いか、d) 医薬品は臨床上、必要量封入するとし、タンパク/ムコ多糖体/亜鉛などの最適比、e) ムコ多糖体としてはコンドロイチン硫酸が良いか、f) 薬物の性質によっては、2価金属イオンのみで栓塞が可能であるなど、個々の医薬品によって異なる。 40

【0042】

【実施例】

以下に、本発明の実施例について記述する。

(実施例1)

180℃で焼成した多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子(HAP)20mgに4.54mg/mlのPC-BDNF(レシチン化BDNF)溶液を66μl加え、ホルテックスにて1分間し、それに0.1%HSA溶液を434μl加え、再び1分間しした。それらを3分間静置させてから1000rpm、3分間の遠心をかけ、上清を回収し、沈に5mM Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>/5% Mannitol溶液を500μl加え、しサンプルを調製した。コントロールとして4.54mg/mlのPC-BDNF溶液を66μlと5% Mannitolを434μlとを混和させたサンプルも調製した。これらを6週齢雄のddマウスの皮下に500μl投与し、投与後、2、7、17時間、1、2、4日後に眼 採血を行い、PC-BDNFの血中濃度をELISA KIT (Promega)にて測定を行った。その結果すぐれた徐放効果が得られた。この結果を図1に示した。

10

【0043】

(実施例2)

225μg/ml IFNα(インターフェロンα、住友製薬) 0.854mlと20mg/ml HSA 1.2mlを混合し、タンパク混合液を調製した。180℃で焼成したHAP 200mgにタンパク混合液 0.856mlを混和ししてタンパクをHAPに封入させた。これに20mg/ml コンドロイチン硫酸(CS, WAKO) 0.05ml、H<sub>2</sub>O 0.074ml、1M Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 0.02mlを順に加えた。15000rpm、5min.の遠心を行い、沈に20mM Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>/5% Mannitol溶液を2ml加えてサンプルとした。コントロールは、IFNα入りタンパク混合液0.856mlにH<sub>2</sub>O 0.644ml、20% Mannitol 0.5ml加えて、これをIFNα(free)の溶液とした。

20

8週齢雄のddマウス(体重33~40g, SLC)に上記で調整したサンプルを0.5ml皮下投与した。投与4時間後、1~10日後までマウスから眼 採血を行い、血液を採取した。この血液のIFNα血中濃度をELISA KIT (Biosource社)にて測定、血中薬物動態を図2に示した。結果、すぐれた徐放効果が得られた。

【0044】

(実施例3)

0.937mg/ml IFNα 0.06mlと20mg/ml HSA 0.3ml、20mg/ml CS 0.03ml、H<sub>2</sub>O 1.22mlを混合し、この溶液に180℃で焼成したHAP 200mgを作用させた。によりタンパクをHAPに封入させた後、H<sub>2</sub>O 10mlを加え、軽くし、3000rpm、5min.で遠心をした。沈を凍結乾燥して、2等分した。一方には20mM Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>/5% Mannitol溶液を1ml、他方には5mM Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>/5% Mannitol溶液1mlを加えた。

30

コントロールとして、0.937mg/ml IFNα 0.015ml、20mg/ml HSA 0.075ml、H<sub>2</sub>O 0.66ml、20% Mannitol 0.25ml加えて、IFNα(free)の溶液として調整した。

7週齢雄のddマウス(体重31~33g, SLC)に上記で調整したサンプルを0.7ml皮下投与した。投与4時間後、1~7日後までマウスから眼 採血を行い、血液を採取した。この血液のIFNα血中濃度をELISA KIT (Biosource社)にて測定、血中薬物動態を図3に示した。結果、亜鉛が20mMの場合は、血中濃度の上昇は不十分であったが著しく長期にわたって徐放を示した。一方、亜鉛が5mMの場合は、血中濃度の上昇は良いが比較的すみやかに血中濃度は低下した。

40

【0045】

(実施例4)

180℃で焼成したHAP 50mgに予め混和しておいたG-CSF、HSA、CaCl<sub>2</sub>溶液(3μg、30μg、280mg/ml)を100μl加え、ホルテックスにて3分間し、5分間静置させ、凍結乾燥した。得られた粒子に220mg/mlのNa<sub>2</sub>

50

CO<sub>2</sub>溶液を100μl加え、ホルテックスにて3分間し、さらに水100μlを加え、軽くした。一部をELISA測定用に採取し、残りを1000rpm、3分間の遠心をかけ、上清を回収、沈にPBS 2mlを加えて、室温で軽く振とうし、0時間、0.5時間後にそれぞれ上清を回収した。さらにその沈にPBS 10mlを加えて室温で振とうし、0時間、0.5時間後にそれぞれ上清を回収、最後の沈と途中で得られた上清をELISA KIT (IBL) により測定した。最後の沈は1% BSA/TriS-HCl (PH5) にて溶解し、ELISA測定用とした。この結果を図4-Aに示した。また、HAP 50mgに1.5μg/mlのG-CSF溶液を200μl加え、多孔を充填し、さらにPBSを2ml加え、同様に放出試験を行った結果を図4-Bに示した。このように栓塞技術により放出は著しく抑えられた。

10

【0046】

(実施例5)

180℃で焼成したHAP 50mgに100mg/mlのSOD溶液を10μlまたは40mg/mlのPC-SOD (レシチン化SOD) 溶液を25μl加え、ホルテックスにて1分間し、それに水を990μlまたは975μl加え、再び1分間した。それらを3分間静置させてから1000rpm、3分間の遠心をかけ、上清を回収し、沈に水2mlを加えし、1000rpm、3分間の遠心をかけ、上清を回収、さらにその沈にPBS 2mlを加えし、1000rpm、3分の遠心をかけ、上清を回収した。これより得られた沈にPBS 1mlを加えて室温で振とうし、0時間、1時間後にそれぞれ上清を回収し、上清と最後の沈はBCA αSSα (PIERCE) により測定した。その結果を図5に示した。このように化学修飾により、HAPへの吸着量が増す蛋白がある。

20

【0047】

(実施例6)

凍結乾燥品と180℃、800℃で焼成したHAP 24mgに5% Mannitolを6ml加えホルテックスで1分間し、HAP溶液を調整した。13週齢雄のWistarラット (体重330.400g, SLIC) の背中3ヶ所に、それぞれのHAP溶液を、投与した場所が重ならないように500μlずつ投与した。これらを2時間、4、7、11、14、18、21日後に背中を切開し、HAPの残存量を写真で撮影した。後日、数名により写真にて、おおよその残存量を目で評価した。その結果、HAPはいずれもほぼ2~3週で消失するが焼成温度が高いほど消失しにくかった。この結果を図6に示した。

30

【0048】

(実施例7) 亜鉛を介したG-CSFのヒドロキシアパタイトへの吸着

40mgのヒドロキシアパタイト粒子をG-CSF溶液 (100μg/ml) 100μl中に10分間浸した後900μlの精製水を加え、遠心分離後上清をすて、再度精製水で沈殿をし遠心分離することによって過剰のG-CSFを除去した。沈殿をPH4の酢酸緩衝液に懸濁し、G-CSFを溶出させ遠心分離後上清のG-CSF量をELISAで測定しG-CSFの吸着量を求めたところ0.1μg以下とほとんど吸着がみられなかった。

40

そこで以下の様な操作で亜鉛をヒドロキシアパタイト粒子に吸着させその粒子へG-CSF吸着を試みた。10mgのヒドロキシアパタイトを200μlの酢酸亜鉛 (5mg/ml) に懸濁、10分間室温に放置後10,000rpmで10分間遠心分離、上清を捨てた。沈殿を500μlの精製水で懸濁し、10分間室温に放置後10,000rpmで10分間遠心分離、上清を捨てた。再度、懸濁、遠心分離後、上清を捨てた。この沈殿を0.5mlの200μg/mlあるいは1000μg/mlのG-CSF溶液中に懸濁し、10分間放置後10,000rpmで10分間遠心分離し、上清のG-CSF量をELISA法で測定した。さらに沈殿を0.1MEDTA、1%HAS溶液でヒドロキシアパタイトに含まれるG-CSFを溶出させ、遠心分離後上清のG-CSF濃度をELISA法で測定しヒドロキシアパタイトへの吸着量を求めた。

50

表1に示すようにあらかじめヒドロキシアパタイトを亜鉛塩で処理することによって10mgのヒドロキシアパタイトに添加したG-CSFの80.0～86.4%が吸着した。10mgのヒドロキシアパタイトに最大400μgのG-CSFを吸着させることができた。

表1 亜鉛を結合させたヒドロキシアパタイト (10mg) へのG-CSFの吸着量

ヒドロキシアパタイト量 (mg)	G-CSF 全量 (μg)	G-CSF 非吸着量 (μg)	G-CSF 吸着量 (μg)
10	100	0.4	86.4
10	500	90.0	400.0

10

【0049】

(実施例8)

多孔性ヒドロキシアパタイト (HAP) を45mg精秤し、それにインターフェロン-α (IFN) の2.4mg/ml溶液からIFNとして30μgを加え、10分間放置した。その後、これに20mM/1mlの酢酸亜鉛溶液を1ml加え、30分間振とうした。この分散液に1.5mlの水を加え、洗浄して洗浄液中IFNを定量したところ、IFNは検出されなかった。すなわち、全てのIFNはHAPに吸着していることが確認された。このように、有機溶媒を使用しないでタンパク質であるIFNを吸着した微粒子製剤をえることができた。洗浄後得られた粉末に20%FCS含有のPBS溶液20mlを加え、37℃で16時間振とうした。上清に溶出してきたIFNを定量して溶出率を算出した。表2に示す結果が得られた。

20

表2 HAPに吸着したIFNの溶出率

溶出したIFN(%)		
HAP	酢酸亜鉛 0mM	92
	酢酸亜鉛 20mM	87

30

酢酸亜鉛の添加によって溶出は抑制され、無添加に比較してより長時間にわたる徐放性を示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ddマウスにおけるPC-BDNF-HAP製剤投与後のPC-BDNFの血中濃度の推移を示す図である。

【図2】 IFNα-HAP製剤投与後ddマウスIFNα血中濃度の推移を示す図である。

40

【図3】 Zn濃度がIFN-HAP製剤の徐放に与える影響を示す図である。

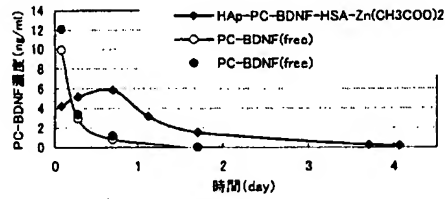
【図4】 栓塞の有・無によるG-CSFのHAPへの結合の違いを示す図である。

【図5】 in vitroにおける医薬品溶出結果を示す図である。

【図6】 焼成温度の違いによる生体内溶解性の比較を示す図である。

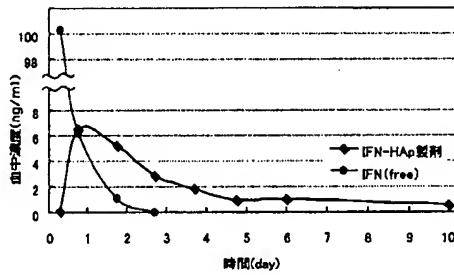
【図 1】

ddyマウスにおけるPC-BDNFの血中濃度の推移  
(PC-BDNF量としてHApサンプルは300  $\mu$ g/匹、freeは150  $\mu$ g/匹を投与)



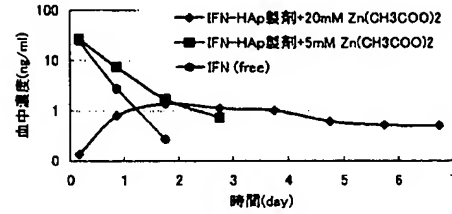
【図 2】

IFN $\alpha$ -HAp製剤投与後のddyマウスIFN $\alpha$ 血中濃度の推移  
(いずれもインターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ )として20  $\mu$ g/匹を投与)



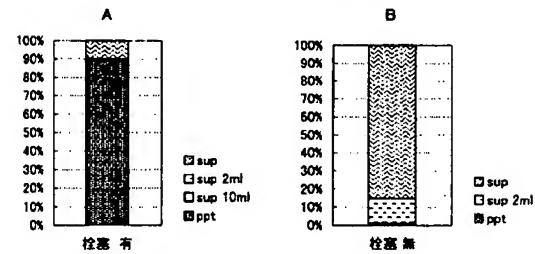
【図 3】

Zn濃度がIFN-HAp製剤の徐放に与える影響  
(いずれもインターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ )として10  $\mu$ g/匹を投与)



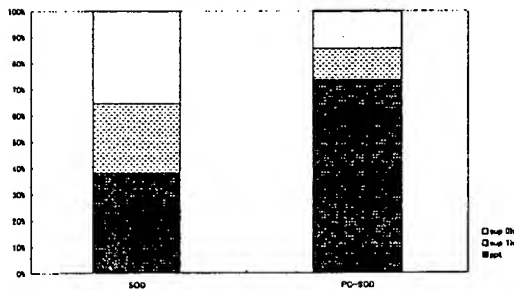
【図 4】

栓塞の有・無によるG-CSFのHApへの結合の違い



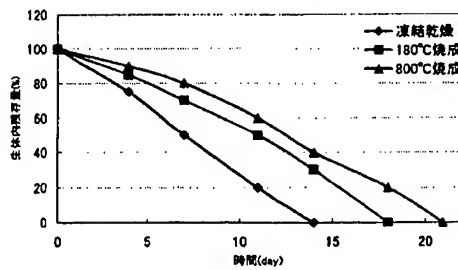
【図 5】

In vitroにおける溶解試験結果



【図 6】

焼成温度の違いによる生体内溶解性の比較



---

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/02

A 6 1 K 47/02

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/42

(72)発明者 生駒 俊之

茨城県つくば市千現 1-14-5-B201

Fターム(参考) 4C076 AA06 AA22 AA33 BB15 BB16 BB31 DD25H DD25M DD26A EE37

EE41 FF22 FF32 FF66 GG04 GG08 GG30 GG37 GG44

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**